

⑫ 公開特許公報(A)

平2-167080

⑮ Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)6月27日

C 12 N 15/40
 //(C 12 N 15/40
 C 12 R 1:92)

ZNA

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全10頁)

⑭ 発明の名称 キュウリモザイクウイルスのゲノムRNA 1 遺伝子

⑰ 特 願 昭63-320015

⑱ 出 願 昭63(1988)12月19日

特許法第30条第1項適用 昭和63年12月10日 日本分子生物学会年会準備委員会発行の「日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集」に発表

⑲ 発 明 者 鈴木 正彦 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 株式会社植物工学研究所内

⑲ 発 明 者 早川 孝彦 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 株式会社植物工学研究所内

⑳ 出 願 人 農業生物遺伝子構造解析技術研究組合 東京都中央区日本橋兜町15-6 製粉会館6階 社団法人農林水産技術情報協会内

㉑ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

明 細 書

1 発明の名称

キュウリモザイクウイルスのゲノムRNA
 1 遺伝子

2 特許請求の範囲

(1) 下記のアミノ酸配列で表される蛋白質をコードするキュウリモザイクウイルスのゲノムRNA 1 遺伝子。

10
 MetAlaThrSerSerPheAsnIleAsnGluLeuValAlaSer
 20
 HisGlyAspLysGlyLeuLeuAlaThrAlaLeuValAspLys
 30 40
 AlaAlaHisGluGlnLeuGluGlnGlnLeuGlnHisGlnArg
 50
 ArgGlyArgLysValTyrValArgAsnValLeuSerValLys
 60 70
 AspSerGluValIleArgAsnArgTyrGlyGlyLysTyrAsp
 80
 LeuHisLeuThrGlnGlnGlnPheAlaProHisGlyLeuAla
 90
 GlyAlaLeuArgLeuCysGluThrLeuAspCysLeuAspSer
 100 110
 PheProSerSerGlyLeuArgGlnAspLeuValLeuAspPhe
 120
 GlyGlySerTrpValThrHisTyrLeuArgGlyHisAsnVal
 130 140
 HisCysCysSerProCysLeuGlyIleArgAspLysMetArg
 150
 HisThrGluArgLeuMetAsnMetArgLysIleIleLeuAsn
 160
 AspProGlnGlnPheAspGlyArgGlnProAspPheCysThr

170 180
 HisProAlaAlaAspCysLysValGlnAlaHisPheAlaIle
 190
 SerIleHisGlyGlyTyrAspMetGlyPheArgGlyLeuCys
 200 210
 GluAlaMetAsnAlaHisGlyThrThrLeuLeuLysGlyThr
 220
 MetMetPheAspGlyAlaMetMetPheAspAspGlnGlyIle
 230
 IleProGluLeuAsnCysGlnTrpArgLysIleArgAsnAla
 240 250
 PheSerGluThrGluAspValThrProLeuValGlyLysLeu
 260
 AsnSerThrValPheSerArgValArgLysPheLysThrLeu
 270 280
 ValAlaPheAspPheIleAsnGluSerThrMetSerTyrVal
 290
 HisAspTrpGluAsnIleLysSerPheLeuThrAspGlnThr
 300
 TyrSerTyrLysGlyMetThrTyrGlyIleGluArgCysVal
 310 320
 IleAsnAlaGlyIleMetThrTyrLysIleIleGlyValPro
 330
 GlyMetCysProProGluLeuIleArgHisCysIleTrpPhe
 340 350
 ProSerIleLysAspTyrValGlyLeuLysIleProAlaSer
 360
 GlnAspLeuValGluTrpLysThrValArgIleLeuThrSer
 370
 ThrLeuArgGluThrGluGluIleAlaMetArgCysTyrAsn
 380 390
 AspLysLysAlaTrpMetGluGlnPheLysValIleLeuGly
 400
 ValLeuSerAlaLysSerSerThrIleValIleAsnGlyMet
 410 420
 SerMetGlnSerGlyGluArgIleAspIleAsnAspTyrHis
 430
 TyrIleGlyPheAlaIleLeuLeuHisThrLysMetLysTyr
 440
 GluGlnLeuGlyLysMetTyrAspMetTrpAsnAlaSerSer

450 460
 IleSerLysTrpPheAlaAlaLeuThrArgArgArgValPhe
 470
 PheSerSerAlaValHisAlaLeuPheProThrLeuArgPro
 480 490
 ArgGluGluLysGluPheLeuIleLysLeuSerThrPheVal
 500
 ThrPheAsnGluGluCysSerPheAspGlyGlyGluGluTrp
 510
 AspValIleSerSerAlaAlaTyrValAlaThrGlnAlaVal
 520 530
 ThrAspGlyLysValLeuAlaAlaGlnLysAlaGluLysLeu
 540
 AlaGluLysLeuAlaGlnProValAspGluValSerAspSer
 550 560
 ProGluValProSerSerThrProAspAspThrAlaAspVal
 570
 CysGlyLysGluGlnGluValSerGluLeuAspSerLeuSer
 580
 AlaGlnThrArgSerProIleThrArgValAlaGluArgAla
 590 600
 ThrAlaMetLeuGluTyrAlaAlaTyrGluLysGlnLeuHis
 610
 AspThrThrValSerAsnLeuLysArgIleTrpAsnMetAla
 620 630
 GlyGlyAspAspLysArgAsnSerLeuGluGlyAsnLeuLys
 640
 PheValPheAspThrTyrPheThrValAspProMetValAsn
 650
 IleHisPheSerThrGlyArgTrpMetArgProValProGlu
 660 670
 GlyIleValTyrSerValGlyTyrAsnGluArgGlyLeuGly
 680
 ProLysSerAspGlyGluLeuPheIleValAsnSerGluCys
 690 700
 ValIleCysAsnSerGluSerLeuSerAlaValThrArgSer
 710
 LeuGlnAlaProThrGlyThrIleSerGlnValAspGlyVal
 720
 AlaGlyCysGlyLysThrThrAlaIleLysSerIlePheGlu

730 740
 ProSerThrAspMetIleValThrAlaAsnLysLysSerAla
 750
 GlnAspValArgMetAlaLeuPheLysSerSerAspSerLys
 760 770
 GluAlaCysAlaPheValArgThrAlaAspSerValLeuLeu
 780
 AsnGluCysProThrValSerArgValLeuValAspGluVal
 790
 ValLeuLeuHisPheGlyGlnLeuCysAlaValMetSerLys
 800 810
 LeuLysAlaValArgAlaIleCysPheGlyAspSerGluGln
 820
 IleAlaPheSerSerArgAspAlaSerPheAspMetArgPhe
 830 840
 SerLysIleIleProAspGluThrSerAspAlaAspThrThr
 850
 PheArgSerProGlnAspValValProLeuValArgLeuMet
 860
 AlaThrLysAlaLeuProLysGlyThrHisSerLysTyrThr
 870 880
 LysTrpValSerGlnSerLysValLysArgSerValThrSer
 890
 ArgSerIleAlaSerValThrLeuValAspLeuAspSerSer
 900 910
 ArgPheTyrIleThrMetThrGlnAlaAspLysAlaSerLeu
 920
 IleSerArgAlaLysGluMetAsnLeuProLysThrPheTrp
 930
 PheTrpAsnGluArgIleLysThrValHisGluSerGlnGly
 940 950
 IleSerGluAspHisValThrLeuValArgLeuLysSerThr
 960
 LysCysAspLeuPheLysGlnPheSerTyrCysLeuValAla
 970 980
 LeuThrArgHisLysValThrPheArgTyrGluTyrCysGly
 990
 ValLeuAsnGlyAspLeuIleAlaGluCysIleAlaArgAla

(2) 下記の D N A 配列で表される キュウリ・モザ

イクウィルスのゲノム R N A I 遺伝子。

ATGGCGAGCTCCTCGTTCAACATCAATGAATTGGTAGCCTCC
 CACGGCGATAAAGGACTACTCGCGACCGCCCTCGTTGATAAGGC
 AGCTCATGAGCAGCTCGAGGAGCAATTACAGCATCAACGTAGGG
 GCGGTAAGGTCTACGTTGGGAACGTTCTGAGCGTAAAGGATTCC
 GAAGTTATTCCGAATCGGTATGGAGGGAAGTACGACCTCCATCT
 TACCCAGCAGGAGTTTGCTCCCCACGGCCTAGCTGGTCCCTCC
 GCTTGTGTGAACTCTCGATTGTCTAGACTCTTCCCTTCTTCA
 GGTCTGCGGCAGGACCTCGTCTTAGACTTCGGAGGAAGTTGGGT
 CACACATTACCTCCGGGACATAACGTACACTGCTGTTCCCTT
 GTTGGGTATCCGTGATAAAATGCGCCACACGGAACGTTTGATG
 AACATGCGCAAGATCATCTTGAACGATCCACAACAGTTCGATGG
 TCGACAGCCGGACTTCTGCACTCATCCTGCTGCTGATTGCAAG
 TACAAGCCCACTTTGCTATATCTATTTCATGGAGGTTATGATATG
 GGCTTTAGAGGATTATGTGAGGCAATGAATGCTCAGGGAACCAC
 CATTTTGAAGGGAACGATGATGTTGGATGGTGGATGATGTTTG
 ACGACCAAGGTATAATTCCCGAAGTTAACTGCCAGTGGAGGAAG
 ATTAGGAACGCTTTCTCGGAACCTGAAGACGTACACCGTTAGT
 TGGTAAACTTAATTCCACAGTGTTTTCCCGCGTGGTAAATTCA
 AGACTTTAGTAGCTTTGATTTTCATTAACGAATCTACTATGCTCT

TATGTCCATGATTGGGAGAACATAAAATCTTTCCTAACGGACCA
 GACTTATTCCTACAAAGGAATGACTTACGGTATTGAACGTTGTG
 TCATCAATGCTGGTATTATGACGTACAAGATTATCGGAGTACCT
 GGGATGTGCCACCCGAACCTATTGACATTGTATCTGGTTCCC
 CTCTATTAAGACTATGTTGGTCTAAAGATTCCCGCGTCCGAGG
 ATCTAGTTGAGTGGAACAGTGGTATTTTAACTCAACATTG
 CGTGAACCTGAAGAGATTGCTATGAGGTGTTACAATGATAAGAA
 GCGGTGGATGGAACAATTTAAGGTTATCTTAGGTGTTCTATCTG
 CTAATCATCTACATTGTTATCAATGGTATGTCCATGCACTCT
 GCGGAACGGATAGACATCAATGATTATCATTACATTGGGTTCGG
 TATTCTTCTTCACACAAAATGAAATATGAGCAGCTAGGGAAAA
 TGTATGATATGTGGAATGCTTCGAGTATTTTGAAGTGGTTTGCA
 GCGTTGACTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
 GCTGTTCCCGACTTTGAGACCCCGTGGGAAAAAGAATTCCTGA
 TTAAGCTCTCCACCTTCGTAACTTTAAAGAGTGGTCACTT
 GATGGTGGAGAGGAATGGGACGTGATATCATCTGCTGCATACGT
 TGCTACACAGGCTGTTACTGATGGGAAGTTTTGGCTGGCAGCA
 AAGCCGAGAAGCTCGCTGAGAAGCTTGACACAACCCGTAGATGAG
 GTATCAGACAGCCCTGAGGTGCCATCTTCAACACCCGATGATAC
 TGCCGATGTTTGTGGAAGGAGCAAGAAGTTTCGGAACCTGACT

CATTGTGGGCTCAGACACGTTCCCCCATCACTAGAGTTGCTGAA
 AGGGCTACTGCCATGCTGGAGTATGCCGCTTATGAGAAACAGCT
 GCATGATACCACAGTGTCCAATCTGAAACGTATTTGGAATATGG
 CGGGCGGTGATGACAAGAGAAATTCCTCGAGGGTAATCTGAAG
 TTGTTTTTCGACACGTATTTTACTGTTGACCCCATGGTGAACAT
 TCACTTTTCGACGGGTGATGGATGGTGCTCTGTGCTGAGGGAA
 TTGTCTACTCTGTTGTTTATAATGAACGGGTTTAGGTCCGAAG
 TCTGATGGAGAGCTTTTCATTGTCAATAGTGAGTGGTGATATG
 TAATAGCGAGTCTTTTATCTGTCTGACGGGCTCTCTTCAAGCTC
 CGACTGGAACCATTAGTCAAGTTGACGGGGTGGCTGGTTGTGGG
 AAAACCACGGCAATTAATCCATTTTTGAGCCGTCCACTGACAT
 GATCGTTACCGGAATAAGAAGTCCGCTCAAGATGTGCGCATGG
 CACTTTTCAAAATCGTCAGACTCCAAAGAAGCATGCGCCTTTGTT
 CGAACAGCCGATTCTGTCTACTTAAATGAATGTCCGACTGTGAG
 TAGGGTTTTGGTTGATGAGGTGCTGTTACTACATTTTGGTCAAC
 TGTGTGCTGTCTATGTCTAACTGAAGGCTGTGCGAGCTATATGT
 TTTGGGGATTGGGAGCAGATTGCTTTTTCTTCTCGAGACGCCCTC
 GTTTGATATGCGTTTTCTCTAAATTTATCTGACGAACTAGTG
 ATGCGGACACCACATTCCGTAGTCCACAAGACGTTGTGCGGCTT
 GTGCGTTTAAATGGCTACGAAGGCCCTTCCGAAAGGAACCCATT

CMVは、3種の粒子より成る一本鎖RNAウイルスとして知られている。ゲノムRNAは、通常、鎖長が約3,300塩基のRNA1、約3,000塩基のRNA2、約2,000塩基のRNA3及び約1,000塩基のRNA4の4本であるが、更に小さなRNA（サテライトRNA）を含むものもある。RNA1はウイルスのH成分に、RNA2及びサテライトRNAはL成分に、そして、RNA3及びRNA4はM成分に存在している。

RNA1及びRNA2には、RNAの複製に必要なRNAレプリカーゼがコードされており、RNA3には、外被蛋白質とウイルスが細胞間を移動するのに必要な蛋白質（3A蛋白質）がコードされている。RNA4は、RNA3の亜ゲノムであって、外被蛋白質がコードされている。サテライトRNAは、ウイルスの増殖や複製には関与していないが、植物の病徴発現の強さに関係があるといわれている。

CMVの宿主範囲は非常に広く、例えば、39科117種以上の植物に感染する系統もある。日

AAAAACACGAAATGGGTTTCTCAATCTAAAGTGAAGAGATCTG
 TCACATCCCGTTCTATTGCTAGTGTGACATTGGTCCACCTGGAT
 TCTTCTAGGTTTTACATCAGGATGACTCAAGCTGATAAAGCTTC
 ACTGATTTCAAGGGCGAAAGAGATGAAGTTACCAAAGACTTTCT
 GGAACGAAAGGATTAACAAACCGTACATGAATCTCAAGGTATTTCT
 GAAGATCACGTTACTTTGGTAAGATTAAAGAGCACAAAGTGTGA
 CCTGTTCAAACAGTTTTCTTATTGTCTTGTGCTTGTGACTAGAC
 ATAAGGTCACATTCCGCTACGAGTATTGTGGTGTATTGAACGGC
 GATTTGATCGCCGAATGTATTGCTCGTGCT

3 発明の詳細な説明

（産業上の利用分野）

本発明は、キュウリモザイクウイルス（以下、「CMV」という。）のゲノムRNAの内、分子量が最大のRNA1がコードする遺伝子に関するものである。

（従来の技術及び発明が解決しようとする問題点）

従来、植物ウイルスとして、タバコモザイクウイルス（以下、「TMV」という。）やCMV等が知られている。これら植物ウイルスは、農作物に病害を与え大きな減収要因となっている。

本国内においては、普通系統（CMV-O）、黄斑系（CMV-Y）による被害が最も大きく、その他に数系統のCMVが知られている。これまでウイルス病に対する有効な防除手段は少なく、TMVにおいて弱毒ウイルスによる干渉作用を利用するものがトマトに用いられているにすぎない。

近年、ウイルスの外被蛋白質をコードしている遺伝子のcDNAを合成し、それをTiプラスミドに組み込んで植物に導入することによって干渉作用をおこさせる試みがなされ、ウイルス耐性植物を作出することに成功している〔サイエンス (Science), 232, 738-743, 1986; バイロロジー (Virology), 159, 299-305, 1987; イーエムピーオージャーナル(EMBO J.), 6, 1845-1851, 1987; EMBO J., 7, 1273-1280, 1988; バイオテクノロジー (Bio/technology), 6, 549-557, 1988]。また、CMVのサテライトRNAを植物に導入することによって、ウイルス耐性植物を得たことが報告されている〔ネイチャー (Nature), 328, 799-802, 1987]。

さらに、アンチセンスRNAを利用したウイルス防除の方法が、微生物を用いた実験系では成功しており [Nature, 315, 601-603, 1985]、植物への応用が期待されている。即ち、ウイルスに基本的な蛋白質の合成や核酸の複製を、センスRNAとそれに相補的なアンチセンスRNAの間にハイブリッドを形成させることにより抑制しようというものである。この技術の確率には、アンチセンスRNAの安定性や、標的とする遺伝子選抜に対する評価が重要である。実際、外被蛋白質にたいするアンチセンスRNAを植物につくらせる試みが成されているが [EMBO J., 7, 1273-1280, 1988; Bio/technology, 6, 549-557, 1988]、有効なウイルス耐性植物を得るには至っていない。これは、外被蛋白質をコードしているRNA 4の *in vivo* での合成量がアンチセンスRNAの合成量に対して大きすぎるためと思われる。

RNA 1はRNA 2と共にRNAレプリカーゼをコードしている。RNAレプリカーゼは、ウイルスの複製に重要な酵素であり、この蛋白質の合

成を抑制することはウイルスの増殖を抑えるのに効果的と考えられる。しかも、*in vivo* での翻訳量は外被蛋白質と比べて少ないことから、より効果的にセンスRNAの働きを抑えると期待される。

そこで、本発明者らは、CMVのRNA 1にコードされている遺伝子を得るべく検討を行った。

従来、オーストラリアのCMV-Q系統についてはRNA 1-4の塩基配列が決定されている

[ヨーロッパジャーナルオブバイオケミストリー (Eur. J. Biochem.), 143, 277-278, 1984; 同 150, 331-339, 1985] が、国内系統のものについては、本発明者らが、CMV-OのRNA 3について報告している (特願昭62-124748号、同62-168150号) が、それ以外は未だ知られていない。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、今般、国内系統のCMVのRNA 1にコードされている遺伝子を取得するに至り、本発明を完成した。

即ち、本発明の要旨は、特定されたアミノ酸配

列で表される蛋白質をコードするキュウリモザイクウイルスのゲノムRNA 1遺伝子に存する。

以下本発明を説明する。

本発明においては、CMV-Oをタバコ葉、キュウリ葉等に接種して、25-27℃で一週間から十日間程度ウイルスを増殖させた後凍結する。凍結した感染葉を粉砕し、更にワーリングブレンダー等で適当な緩衝液中で破砕する。得られた破砕液を13,000xgで10分間程度遠心して残渣と下層のクロロホルム層を除去し、上層(水層)を150,000xgで90分間程度遠心する。沈澱を適当な緩衝液に懸濁し、トリトンX-100を加えて140,000xgで90分間程度遠心し、ウイルス粒子を含む画分を沈澱として得る。更に、塩化セシウムの密度勾配遠心によりウイルス粒子を分離精製する。こうして得たウイルス粒子より常法に従ってRNAを単離精製する。

RNA 1-4の混合液を用いてcDNAを合成する。まず、RNAの3'末端の塩基配列を直接シーケンスにより決定し、これよりプライマー

を合成する。全RNAを鋳型として、逆転写酵素を使用して常法に従い、cDNAを合成する。得られるcDNAは、1本鎖であるので、これを鋳型として常法に従い2本鎖cDNAを合成する。これをpUC系統 [ジーン(Gene), 19, 259-268, 1982; Gene, 33, 103-119, 1985] や、M13mp系統 [メリッツ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 101, 20-77, 1983] 等のベクターに導入し、大腸菌(HB101やJM109等)に形質転換してクローニングする。得られたクローンが、4本のRNAのどれに対応するか調べるために、各クローンをプローブとしてCMVの全RNAを鋳型としてノーザンハイブリダイゼーション (northern hybridization)を行う。かくして、目的のゲノム-RNA 1-にハイブリダイズするクローンを選ぶことができる。

(発明の効果)

本発明のRNA 1がコードする遺伝子は、CMVに対して抵抗性の植物を作出するのに有効と考えられる。

(実施例)

以下に実施例を挙げて具体的に本発明を説明する。

実施例

(1) CMV-Oの純化とウイルスRNAの単離

① CMV-O接種後、25～27℃の温度で1週間から10日間保持したタバコ葉(KY-57)100gを凍結した。凍結した感染葉を木槌で粉碎後、10mMEDTAを含む0.5Mクエン酸緩衝液(pH6.5)100mlとクロロホルム100mlを加え、ワーリングブレンダー(約15,000rpm)で破碎した。この破碎液を、13,000×gで10分間遠心し、上層(水層)をさらに150,000×gで90分間遠心した。得られた沈殿に、1mMEDTAを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2)10mlを加え、テフロンホモゲナイザーで十分に懸濁均一化した。0℃で2時間以上静置した後、最終濃度で1%になるように、トリトンX-100を加えて140,000×gで90分間遠心し、沈殿を上記のリン酸緩衝液1

mlに懸濁した。これを塩化セシウムの段階的な密度勾配(20,30,40,50%w/v、各1ml)に重層し、240,000×gで4時間遠心した。白い帯が肉眼で確認できるので、この画分を集めさらに140,000×gで90分間遠心し、沈殿を上記のリン酸緩衝液1mlに懸濁した。

② 上記の方法で得たウイルス懸濁液に、最終濃度で1%SDS、12.5mg/mlベントナイトとなるように加え、さらにフェノールを等量加えて蛋白質を除去後、常法に従ってエタノール沈殿をくり返してRNAを単離精製した。この方法で、感染葉100gより約2mgのRNAを得た。

(2) RNA1の3'末端の塩基配列の決定

① 3'末端の標識: 上記で得た4μgのCMV-ORNAを含む溶液(100mMHESPES-NaOH(pH7.5)/100mM MgCl₂/100mMDTT/0.1%(w/v)BSA/2mMATP/10%(v/v)DMSO)に50μCiのCytidine3',5'-[5'-³²P]bisphosphateと大腸菌T4RNAリガーゼ(10unit)を加え、4℃で16時間反応させ、R

NA3'末端に標識した。フェノールで蛋白質を除去後、エタノール沈殿でRNAを回収し、8M尿素を含む24%ポリアクリルアミドゲルにのせ電気泳動を行った。120Vの定電圧で色素マーカーが抜け出るまで泳動し、オートラジオグラフィでRNAバンドの位置を確認後、目的の鎖長が約3,300塩基のRNA1を常法に従ってゲルより切り出して回収した。

② 科学修飾によるRNA塩基配列の決定: Peattieの方法【プロシーディングズ オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンシズ オブ ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 76, 1760-1764, 1979】に従った。即ち、ジメチル硫酸でグアニンを、ジエチルピロカーボネートでアデニンを化学修飾し、また、シチジンとウリジンを、塩濃度を変えてヒドラジンで化学修飾した。これらを酸性条件下(pH4.5)でアニリンを用いて切断後、8M尿素を含む20%ポリアクリルアミドゲルにのせ電気泳動し、オートラジオグラフィをとり塩基配列を決定した。

CMV-ORNA1の3'端より18個の塩基配列を以下に示した。

3'-ACCAGAGGA⁵AA¹⁰ACCUC¹⁵GG-5'

この配列は、CMV-ORNA2、RNA3と全く等しかった。

(3) cDNAの合成

20μlの緩衝液(50mM Tris-HCl, pH8.3, 0.15MKCl)に鋳型RNAとして、上記(1)で得た全RNA(12μg)と、プライマーとして、上記(2)で決定した3'末端配列に相補的な合成DNAを過剰量(0.4μg)溶かして極細のガラス管に封入し、これを90℃に加熱した後除冷することにより、RNAとプライマーを会合させた。この溶液を最終濃度が100μl中、50mMTris-HCl, pH8.3/10mM MgCl₂/10mMDTT/100μg/ml CMV-ORNAとなるようにした後、4種のデオキシスクレオチド3リン酸を1mMになるように加え、100unitの逆転写酵素を加えて42℃で90分間反応を行ない、cDNAの一本鎖目を合成した。フェノール抽出、エ

タノール沈殿の後、100 μ l の緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 5 mM MgCl₂ / 100 mM KCl / 10 mM (NH₄)₂SO₄ / 150 mM NaCl / 50 μ g / ml BSA) に溶かし、さらに、4 種のデオキシリボスクレオチド 3 リン酸を 40 μ M になるよう加えた。これに RNase H (10 unit)、大腸菌リガーゼ (10 unit)、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I (250 unit) を加え、12 $^{\circ}$ C で 60 分間、次いで 22 $^{\circ}$ C で 75 分間反応を行ない、二本鎖 cDNA を合成した。フェノール抽出、エタノール沈殿で核酸を回収する。

これを緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0 / 10 mM EDTA / 80 μ M Adenosyl methionine / 400 μ g / ml BSA) 40 μ l に溶かし、EcoRI methylase (40 unit) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応を行ない EcoRI 部位をメチル化した。フェノール抽出、エタノール沈殿の後、T4 ポリメラーゼで平滑末端にした後 (33 mM Tris-acetate, pH 7.9 / 66 mM KCH₃COO / 10 mM Mg(CH₃COO)₂ / 0.5 mM DTT / 0.1 mg / ml BSA, 37 $^{\circ}$ C、1 時

トセル 100 μ l に加え、水中で 30 分間静置した後、アンピシリン (30 μ g / ml) を含む LB 寒天培地で選抜し、アンピシリン耐性コロニーを得た。この中から、アルカリ-S.D.S 法でミニスクリーニングを行ない、2.0 Kbp 前後の挿入 DNA を持つクローンをいくつか得た。これらのクローンよりプラスミド DNA を抽出し、EcoRI フラグメントを回収した。これらのフラグメントをプローブとし、CMV の前 RNA を鋳型として常法に従いノーザンブロットング northern blotting を行なった。3 つのクローンが RNA 1 と強くハイブリダイズし、RNA 1 の DNA を得ることができた。最長、2.5 Kbp のクローンを得ることができた。残りの部分は、シーケンスを決めた後適当な合成プライマーを作り、プライマーエクステンションを行なって、ほぼ全長をカバーする cDNA を得た。

上記 (4) で得たクローンから EcoRI フラグメントを切り出し、M13 mp18 にサブクローニングし

間)、EcoRI リンカーライゲーションを宝酒造社製ライゲーションキットを用いて行なった。

フェノール抽出、エタノール沈殿で核酸を回収した後、EcoRI (10 unit) を反応させた (37 $^{\circ}$ C、1 時間)。水を加えて 50 μ l にし、5-15% の NaCl グラジエント (5 ml) に重層、170,000 \times g で 4 時間遠心した。これを分画し、鎖長が 1 Kbp 以上の部分 (上層より約 3.7 ml) をエタノール沈殿により回収した。これを常法に従ってベクター pBR322 の EcoRI 部位に挿入した。

(4) クローニング

形質転換は、Hanahan の方法 [ディーエヌエークローニング (DNA cloning), vol 1, pp109-136, 1985] を改良したものに従った。大腸菌 HB 101 を 0.1 M KCl / 45 mM MnCl₂ / 10 mM CaCl₂ / 10 mM KCl₂COO / 10% グリセロール / 3 mM 塩酸ヘキサコバラミンを含む pH 6.4 の緩衝液で 0 $^{\circ}$ C で処理し、さらに DMSO を最終濃度が 7% になるように加え、コンピテントセルを調製した。上記 (3) で得た DNA 溶液 5-10 μ l をコンピテン

た。両方向に挿入されたクローンを選抜し、宝酒造製キロシークエンス用デレーションキットを用いて欠損変異株を作製した。即ち、BamHI と PstI 部位で挿入 DNA をもつ mp18 を切断後、エキソヌクレアーゼ III と緑豆ヌクレアーゼによって DNA を BamHI 部位から挿入し、DNA 方向へ消化した。この反応を経時的に停止させ、平滑末端にした後、閉環した。これを上記 (4) で示したように形質転換させて適当な長さの塩基配列をもつ欠損変異株を選抜した。各変異株の塩基配列は、ジデオキシ法で決定した。同様にして、プライマーエクステンションで得た cDNA の塩基配列も決定した。5' 末端の塩基配列は、合成プライマーを作り、RNA の直接シーケンス [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 3371-3375, 1986] により決定した。十鎖と一鎖の DNA の塩基配列は全く相補的であることを確認した。図 1 には、一般的な遺伝コードを用いて翻訳した RNA 1 の読み取り枠のアミノ酸配列を示した。

4. 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例で得られた + 鎖の c D N A の塩基配列を示す図面である。図中、読み取り枠は 9 1 番目から 3 0 7 2 番目のストップコドンまでである。

出願人 農業生物遺伝子構造解析技術研究組合

代理人 弁理士 長 谷 川 一

ほか 1 名

図 1 (その 1)

```

      10      20      30      40      50      60      70
GTTTTATTTACAAGAGCGTACGGTTCAACCCCTGCCTCCTCTGTAAAACTACCCTTTGAAAACCTCTCTTTC

      82      92     102     112     122     132     142
TTAATCTTTTCTTTGTAAATTCCTATGGCGACGTCCTCGTTCAACATCAATGAATTGGTAGCCTCCCACGGC
      MetAlaThrSerSerPheAsnIleAsnGluLeuValAlaSerHisGly

      154     164     174     184     194     204     214
GATAAAGGACTACTCGCGACCGCCCTCGTTGATAAGGCAGCTCATGAGCAGCTCGAGGAGCAATTACAGCAT
AspLysGlyLeuLeuAlaThrAlaLeuValAspLysAlaAlaHisGluGlnLeuGluGlnLeuGlnHis

      226     236     246     256     266     276     286
CAACGTAGGGGCCGTAAGGTCTACGTTTCGGAACGTTCTGAGCGTAAAGGATTCCGAAGTTATTCGGAATCGG
GlnArgArgGlyArgLysValTyrValArgAsnValLeuSerValLysAspSerGluValIleArgAsnArg

      298     308     318     328     338     348     358
TATGGAGGGAAGTACGACCTCCATCTTACCCAGCAGGAGTTTGCTCCCGACGGCCTAGCTGGTGCCCTCCGC
TyrGlyGlyLysTyrAspLeuHisLeuThrGlnGlnGluPheAlaProHisGlyLeuAlaGlyAlaLeuArg

      370     380     390     400     410     420     430
TTGTGTGAAACTCTCGATTGTCTAGACTCTTTCCTTCTTCAGGTCTGCGGCAGGACCTCGTCTTAGACTTC
LeuCysGluThrLeuAspCysLeuAspSerPheProSerSerGlyLeuArgGlnAspLeuValLeuAspPhe

      442     452     462     472     482     492     502
GGAGGAAGTTGGGTACACATTACCTCCGCGGACATAACGTACACTGCTGTTCCCTTGTGGGTATCCGT
GlyGlySerTrpValThrHisTyrLeuArgGlyHisAsnValHisCysCysSerProCysLeuGlyIleArg

      514     524     534     544     554     564     574
GATAAAATGCGCCACACGGAACGTTTGATGAACATGCGCAAGATCATCTTGAACGATCCACAACAGTTTCGAT
AspLysMetArgHisThrGluArgLeuMetAsnMetArgLysIleIleLeuAsnAspProGlnGlnPheAsp

```

図 1 (その2)

586 596 606 616 626 636 646
 GGTGACAGCCGGACTTCGCACTCATCCTGCTGCTGATTGCAAAGTACAAGCCCACTTTGCTATATCTATT
 GlyArgGlnProAspPheCysThrHisProAlaAlaAspCysLysValGlnAlaHisPheAlaIleSerIle
 658 668 678 688 698 708 718
 CATGGAGGTTATGATATGGGCTTTAGAGGATTATGTGAGGCAATGAATGCTCACGGAACCACCATTTTGAAG
 HisGlyGlyTyrAspMetGlyPheArgGlyLeuCysGluAlaMetAsnAlaHisGlyThrThrIleLeuLys
 730 740 750 760 770 780 790
 GGAACGATGATGTTTCGATGGTGGCGATGATGTTTGACGACCAAGGTATAATTCCCGAACTTAACTGCCAGTGG
 GlyThrMetMetPheAspGlyAlaMetMetPheAspAspGlnGlyIleIleProGluLeuAsnCysGlnTrp
 802 812 822 832 842 852 862
 AGGAAGATTAGGAACGCTTTCTCCGAAACTGAAGACGTCACACCGTTAGTTGGTAACTTAACTCCACAGTG
 ArgLysIleArgAsnAlaPheSerGluThrGluAspValThrProLeuValGlyLysLeuAsnSerThrVal
 874 884 894 904 914 924 934
 TTTTCCCGCGTGCGTAAATTCAAGACTTTAGTAGCTTTGATTTCATTACGAATCTACTATGTCTTATGTC
 PheSerArgValArgLysPheLysThrLeuValAlaPheAspPheIleAsnGluSerThrMetSerTyrVal
 946 956 966 976 986 996 1006
 CATGATTGGGAGAACATAAAATCTTCTTAACGGACCACTTATTCTTACAAAGGAATGACTTACGGTATT
 HisAspTrpGluAsnIleLysSerPheLeuThrAspGlnThrTyrSerTyrLysGlyMetThrTyrGlyIle
 1018 1028 1038 1048 1058 1068 1078
 GAACGTTGTGTCAATGCTGGTATTATGACGTACAAGATTATCGGAGTACCTGGGATGTGCCACCCGAA
 GluArgCysValIleAsnAlaGlyIleMetThrTyrLysIleIleGlyValProGlyMetCysProProGlu
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150
 CTCATTGACATTGTATCTGGTCCCTCTATTAAAGACTATGTTGGTCTAAAGATTCCCGCGTCGCAGGAT
 LeuIleArgHisCysIleTrpPheProSerIleLysAspTyrValGlyLeuLysIleProAlaSerGlnAsp

図 1 (その3)

1162 1172 1182 1192 1202 1212 1222
 CTAGTTGAGTGGAACAGTGCGTATTTTAACGTCAACATTGCGTGAAACTGAAGAGATTGCTATGAGGTGT
 LeuValGluTrpLysThrValArgIleLeuThrSerThrLeuArgGluThrGluGluIleAlaMetArgCys
 1234 1244 1254 1264 1274 1284 1294
 TACAAATGATAAGAAGCGTGATGGAACAATTTAAGGTTATCTTAGGTGTTCTATCTGCTAAATCATCTACC
 TyrAsnAspLysLysAlaTrpMetGluGlnPheLysValIleLeuGlyValLeuSerAlaLysSerSerThr
 1306 1316 1326 1336 1346 1356 1366
 ATTGTTATCAATGGTATGTCCATGCAGTCTGGCGAACGGATAGACATCAATGATTATCATTACATTGGGTTT
 IleValIleAsnGlyMetSerMetGlnSerGlyGluArgIleAspIleAsnAspTyrHisTyrIleGlyPhe
 1378 1388 1398 1408 1418 1428 1438
 GCTATTCTTCTTACACAAAAATGAAATATGAGCAGCTAGGGAAAAATGTATGATATGTGGAATGCTTCGAGT
 AlaIleLeuLeuHisThrLysMetLysTyrGluGlnLeuGlyLysMetTyrAspMetTrpAsnAlaSerSer
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510
 ATTTGGAAGTGGTTTGCAGCGTTGACTCGTCGTCGCGTGTCTTCTAGTGCTGTTTCATGCGCTGTTCCCG
 IleSerLysTrpPheAlaAlaLeuThrArgArgArgValPhePheSerSerAlaValHisAlaLeuPhePro
 1522 1532 1542 1552 1562 1572 1582
 ACTTTGAGACCCCGTGAGGAAAAAGAATTCCTGATTAAAGCTCTCCACCTTCGTAACCTTTAATGAAGAGTGC
 ThrLeuArgProArgGluGluLysGluPheLeuIleLysLeuSerThrPheValThrPheAsnGluGluCys
 1594 1604 1614 1624 1634 1644 1654
 TCATTTGATGGTGGAGAGGAATGGGACGTGATATCATCTGCTGCATACGTTGCTACACAGGCTGTTACTGAT
 SerPheAspGlyGlyGluGluTrpAspValIleSerSerAlaAlaTyrValAlaThrGlnAlaValThrAsp
 1666 1676 1686 1696 1706 1716 1726
 GGGAAAGTTTTGGCTGCGCAGAAAGCCGAGAAGCTCGCTGAGAAGCTTGACAAACCCGTAGATGAGGTATCA
 GlyLysValLeuAlaAlaGlnLysAlaGluLysLeuAlaGluLysLeuAlaGlnProValAspGluValSer

図 1 (404)

1738 1748 1758 1768 1778 1788 1798
 GACAGCCCTGAGGTGCCATCTTCAACACCCGATGATACTGCCGATGTTTGTGGAAAGGAGCAAGAAGTTTCG
 AspSerProGluValProSerSerThrProAspAspThrAlaAspValCysGlyLysGluGlnGluValSer
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870
 GAACTTGACTCATTGTCGGCTCAGACACGTTCCCCCATCACTAGAGTTGCTGAAAGGGCTACTGCCATGCTG
 GluLeuAspSerLeuSerAlaGlnThrArgSerProIleThrArgValAlaGluArgAlaThrAlaMetLeu
 1882 1892 1902 1912 1922 1932 1942
 GAGTATGCCGCTTATGAGAAACAGCTGCATGATACCACAGTGTCCAATCTGAAACGTATTTGGAATATGGCG
 GluTyrAlaAlaTyrGluLysGlnLeuHisAspThrThrValSerAsnLeuLysArgIleTrpAsnMetAla
 1954 1964 1974 1984 1994 2004 2014
 GGCGGTGATGACAAGAGAAATTCCTCGAGGGTAATCTGAAGTTCGTTTTCGACACGTATTTTACTGTTGAC
 GlyGlyAspAspLysArgAsnSerLeuGluGlyAsnLeuLysPheValPheAspThrTyrPheThrValAsp
 2026 2036 2046 2056 2066 2076 2086
 CCCATGGTGAACATTCACTTTTTCGACGGGTCGATGGATGCGTCCTGTGCCTGAGGGAATTGTCTACTCTGTT
 ProMetValAsnIleHisPheSerThrGlyArgTrpMetArgProValProGluGlyIleValTyrSerVal
 2098 2108 2118 2128 2138 2148 2158
 GGTTATAATGAACGCGGTTTAGGTCCGAAGTCTGATGGAGAGCTTTTCATTGTCAATAGTGAGTGCGTGATA
 GlyTyrAsnGluArgGlyLeuGlyProLysSerAspGlyGluLeuPheIleValAsnSerGluCysValIle
 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230
 TGTAAATAGCGAGTCTTTATCTGCTGTACGCGCTCTCTTCAAGCTCCGACTGGAACCATTAGTCAAGTTGAC
 CysAsnSerGluSerLeuSerAlaValThrArgSerLeuGlnAlaProThrGlyThrIleSerGlnValAsp
 2242 2252 2262 2272 2282 2292 2302
 GGGGTCGCTGGTTGTGGGAAAACCACGGCAATTAAATCCATTTTTGAGCCGTCCACTGACATGATCGTTACC
 GlyValAlaGlyCysGlyLysThrThrAlaIleLysSerIlePheGluProSerThrAspMetIleValThr

図 1 (405)

2314 2324 2334 2344 2354 2364 2374
 GCGAATAAGAAGTCCGCTCAAGATGTGCGCATGGCACTTTTCAAATCGTCAGACTCCAAAGAAGCATGCGCC
 AlaAsnLysLysSerAlaGlnAspValArgMetAlaLeuPheLysSerSerAspSerLysGluAlaCysAla
 2386 2396 2406 2416 2426 2436 2446
 TTTGTTGGAACAGCCGATTCTGTCTACTTAATGAATGTCCGACTGTGAGTAGGGTTTTGGTTGATGAGGTC
 PheValArgThrAlaAspSerValLeuLeuAsnGluCysProThrValSerArgValLeuValAspGluVal
 2458 2468 2478 2488 2498 2508 2518
 GTGTTACTACATTTTGGTCAACTGTGTGCTGTCTAACTGAAGGCTGTGCGAGCTATATGTTTTGGG
 ValLeuLeuHisPheGlyGlnLeuCysAlaValMetSerLysLeuLysAlaValArgAlaIleCysPheGly
 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590
 GATTCGGAGCAGATTGCTTTTTCTTCTCGAGACGCTCGTTTGATATGCGTTTCTCTAAATTTATTCCTGAC
 AspSerGluGlnIleAlaPheSerSerArgAspAlaSerPheAspMetArgPheSerLysIleIleProAsp
 2602 2612 2622 2632 2642 2652 2662
 GAACTAGTGATGCGGACACCACATTCCGTAGTCCACAAGACGTTGTGCCGCTTGTGCGTTTAATGGCTACG
 GluThrSerAspAlaAspThrThrPheArgSerProGlnAspValValProLeuValArgLeuMetAlaThr
 2674 2684 2694 2704 2714 2724 2734
 AAGGCCCTTCCGAAAGGAACCCATTCAAATACACGAAATGGGTTTCTCAATCTAAAGTGAAGAGATCTGTC
 LysAlaLeuProLysGlyThrHisSerLysTyrThrLysTrpValSerGlnSerLysValLysArgSerVal
 2746 2756 2766 2776 2786 2796 2806
 ACATCCCGTTCTATTGCTAGTGTGACATTGGTCGACCTGGATTCTTCTAGGTTTTACATCAGATGACTCAA
 ThrSerArgSerIleAlaSerValThrLeuValAspLeuAspSerSerArgPheTyrIleThrMetThrGln
 2818 2828 2838 2848 2858 2868 2878
 GCTGATAAAGCTTCACTGATTTCAAGGGCGAAAGAGATGAACTTACCAAAGACTTTCTGGAACGAAAGGATT
 AlaAspLysAlaSerLeuIleSerArgAlaLysGluMetAsnLeuProLysThrPheTrpAsnGluArgIle

図1 (その6)

2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950
 AAAACCGTACATGAATCTCAAGGTATTTCTGAAGATCACGTTACTTTGGTAAGATTAAAGAGCACAAAGTGT
 LysThrValHisGluSerGlnGlyIleSerGluAspHisValThrLeuValArgLeuLysSerThrLysCys
 2962 2972 2982 2992 3002 3012 3022
 GACCTGTTCAAACAGTTTTCTTATTGTCTTGTTGCTTTGACTAGACATAAGGTCACATTCCGCTACGAGTAT
 AspLeuPheLysGlnPheSerTyrCysLeuValAlaLeuThrArgHisLysValThrPheArgTyrGluTyr
 3034 3044 3054 3064 3074 3084 3094
 TGTGGTGTATTGAACGGCGATTTGATCGCCGAATGTATTGCTCGTGTAGCGGTTTCCCTCCTTCGGGCGG
 CysGlyValLeuAsnGlyAspLeuIleAlaGluCysIleAlaArgAla
 3106 3116 3126 3136 3146 3156 3166
 GATCTGAGTTGGCGGTAATCTACAAACCGTCTGAGGTCACATAAACGTTAACGGTTACGTTTTCGGTGAACGG
 3178 3188 3198 3208 3218 3228 3238
 GTTGTCCATCCAGCTTACGGCTAAAATGGTCAGTCGTGGAGAAATCCACGCCAGTAGACTTACAAGTCTCTG
 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310
 AGGCGCCTTTGAAACCATCTCCTAGGTTTCTTCGGAAGGACTTCTGTCCGTGTACTTCTAGTACAATGTGCT
 3322 3332 3342 3352 3362
 AGTTTCAGGGTACGGGTGCCCCCCTTTCGTGGGGGCTCCAAAAGGAGACCA

手続補正書 (自発)

平成1年7月14日

特許庁長官 吉田文毅 殿

1 事件の表示

昭和63年特許願第320015号

2 発明の名称

キュウリモザイクウイルスのゲノム

RNA1遺伝子

3 補正をする者

出願人

農業生物遺伝子構造解析技術研究組合

4 代理人 〒100

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

三菱化成株式会社内

TEL. (283) 6976

(6806) 弁理士 長谷川

(ほか1名)

6 補正の内容

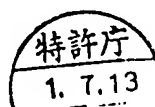
- (1) 明細書第14頁下から第6行に「ハイブリ
ダイズ」とあるを、「ハイブリダイズ」と訂
正する。
- (2) 同第18頁下から第9行に「徐冷する」と
あるを、「徐冷する」と訂正する。

以上

5 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

方式 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.